

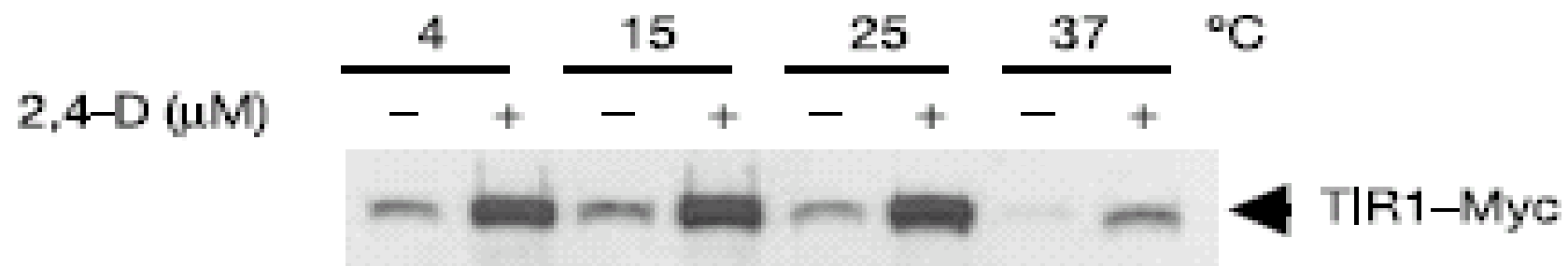
The F-Box protein TIR1 is an auxin receptor

Nihal Dharmasiri, Sunethra Dharmasiri
& Mark Estelle

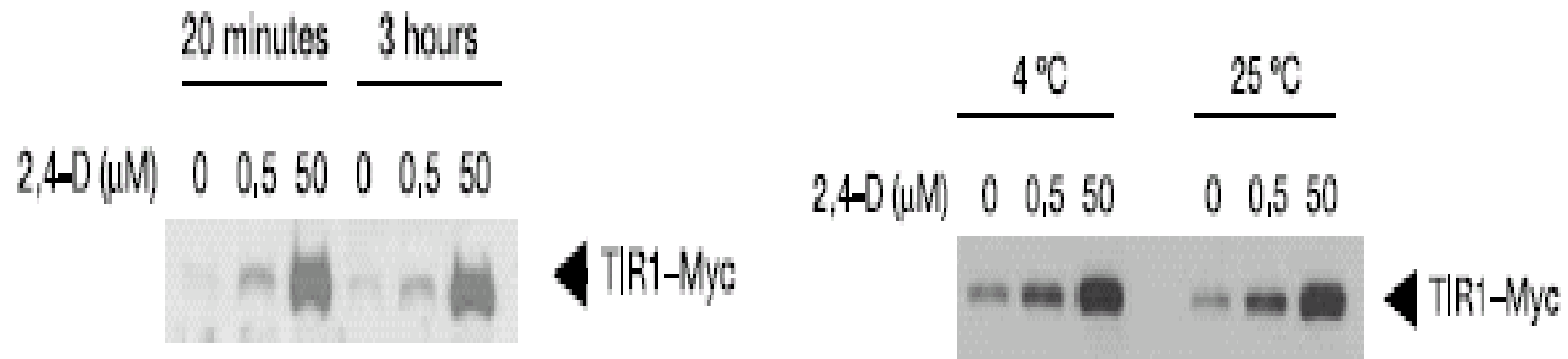
Department of Biology, Indiana University, USA

Hypothese : Substrat-Erkennung durch die E3 Ligase benötigt eine Auxin-abhängige stabile Modifikation von TIR1 oder assoziierten Proteinen

- Frage : Ist die Aux/IAA – SCF^{TIR1} Protein Interaktion Temperaturabhängig?

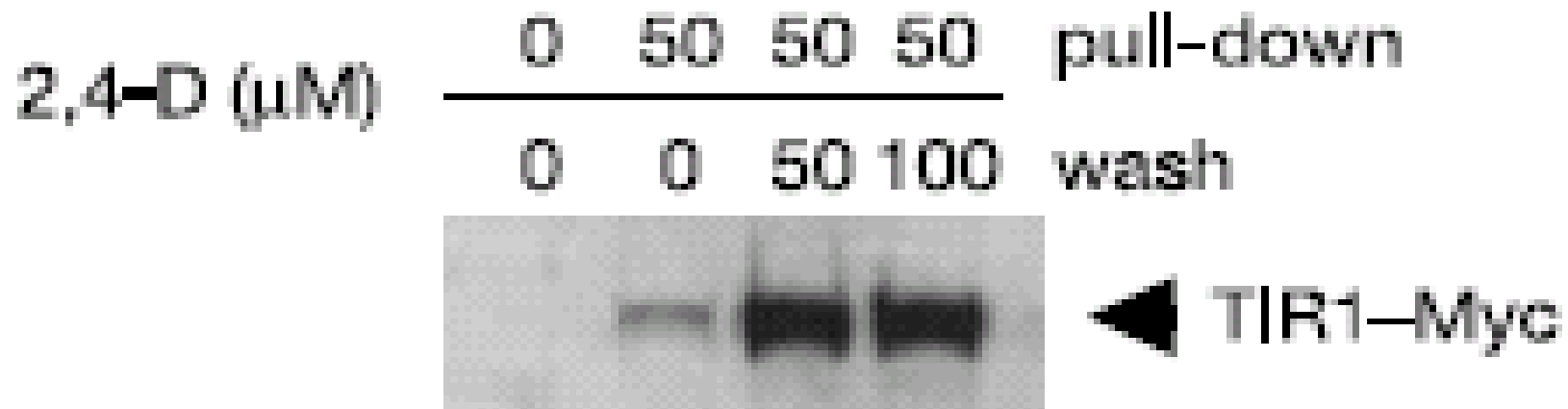


Immunoblots der pull down Reaktion



- Fazit : Auxinwirkung ist weitestgehend Temperatur-unabhängig
→ keine Enzym-basierende stabile Modifikation von TIR1 oder assoziierten Proteinen

Hypothese : Die Aux/IAA – SCF^{TIR1} Protein
Interaktion ist vielleicht
abhängig von einer kontinuierlicher
Auxinpräsenz



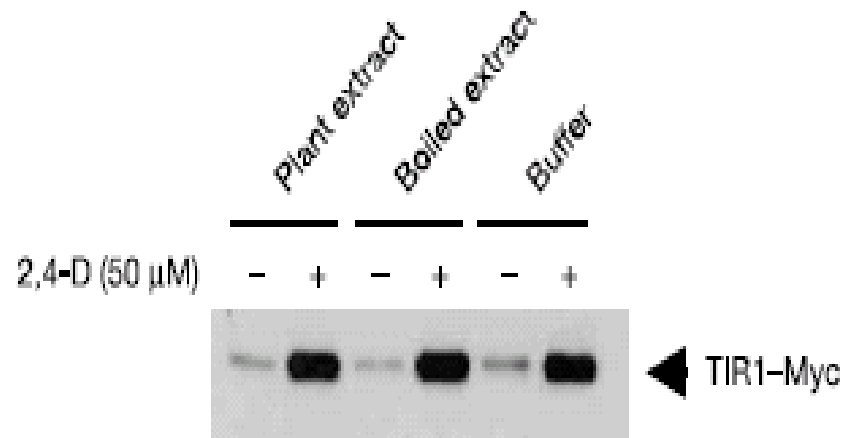
- Fazit : Auxin im Waschpuffer erhöht stark die Detektion von TIR1-Myc

- Auxin stabilisiert die Interaktion zwischen TIR1 und den Aux/IAA Proteinen
- Auxin ist kontinuierlich nötig für diesen Effekt

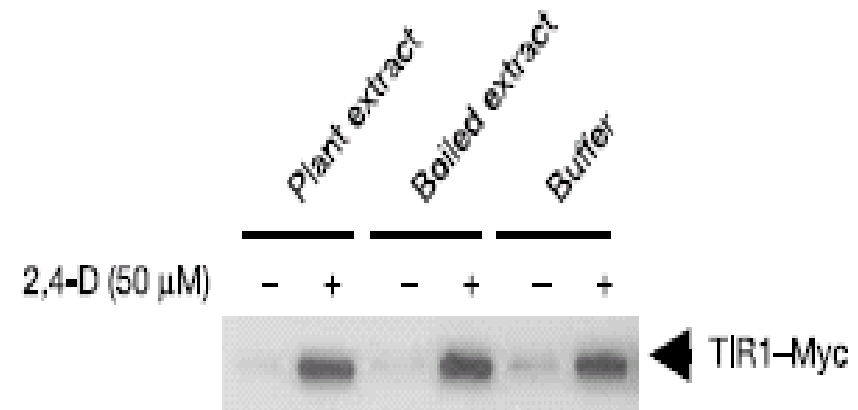
Auxin-induzierte Interaktion zwischen Aux/IAA und SCF^{TIR1} ist abhängig von der Auxinkonzentration und unabhängig von der Temperatur!

Frage : Ist einzeln aufgereinigtes TIR1-Myc in der Lage mit GST-IAA7 zu interagieren?

- TIR1-Myc aus Rohextrakt mit Myc - AK immunopräzipitiert
- gereinigtes TIR1-Myc in pull-down assay mit GST-IAA7 eingesetzt



→ immunopräzipitiertes TIR1-Myc interagiert mit GST-IAA7 ähnlich wie im Rohextrakt

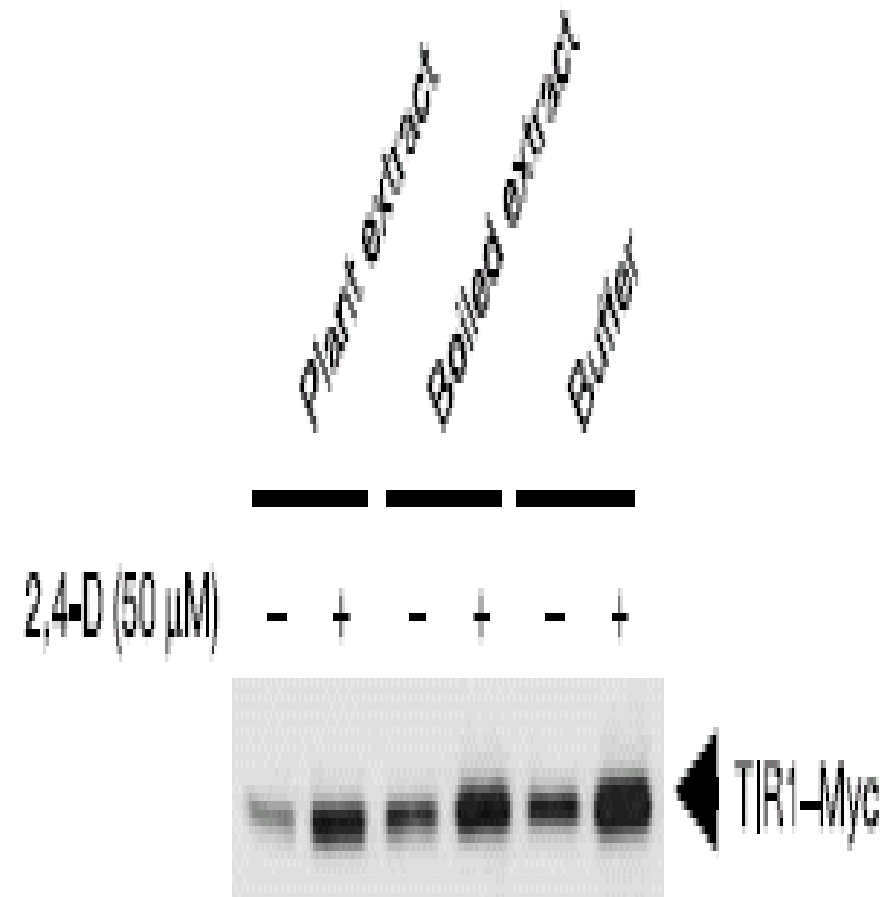


→ Vorbehandlung mit Auxin hat keinen Effekt auf die Proteininteraktion

Frage : Ist es möglich TIR1-Myc über seine
Bindung an GST-IAA7 zu isolieren?

- Pull down assay
- TIR-Myc über Gluthation beads gereinigt
- Eluiertes TIR1-Myc in 2. pull down assay eingesetzt

→ über GST-IAA7-
Bindung gereinigtes
TIR1-Myc ist immer
noch responsiv zu
Auxin

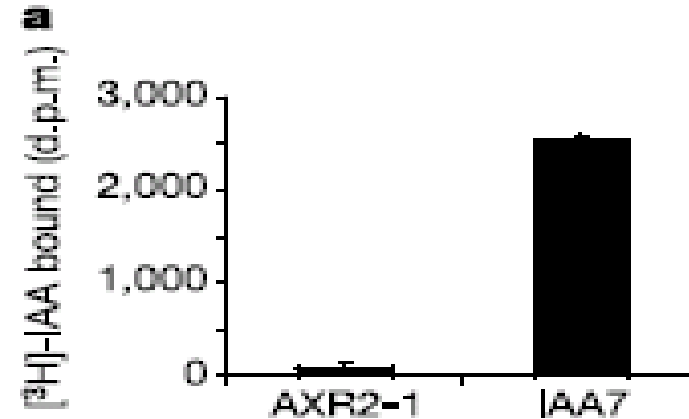


Fazit

- Vorbehandlung mit Auxin keinen Effekt
 - Auxin verursacht keine stabilen Modifikationen an TIR1 oder assoziierten Proteinen
- immunopräzipitiertes TIR1-Myc interagiert mit GST-IAA7 wie im Rohextrakt
 - alle nötigen Faktoren für eine Auxin-induzierte Proteininteraktion, auch der Rezeptor, befinden sich im anti-Myc Immunopräzipitat

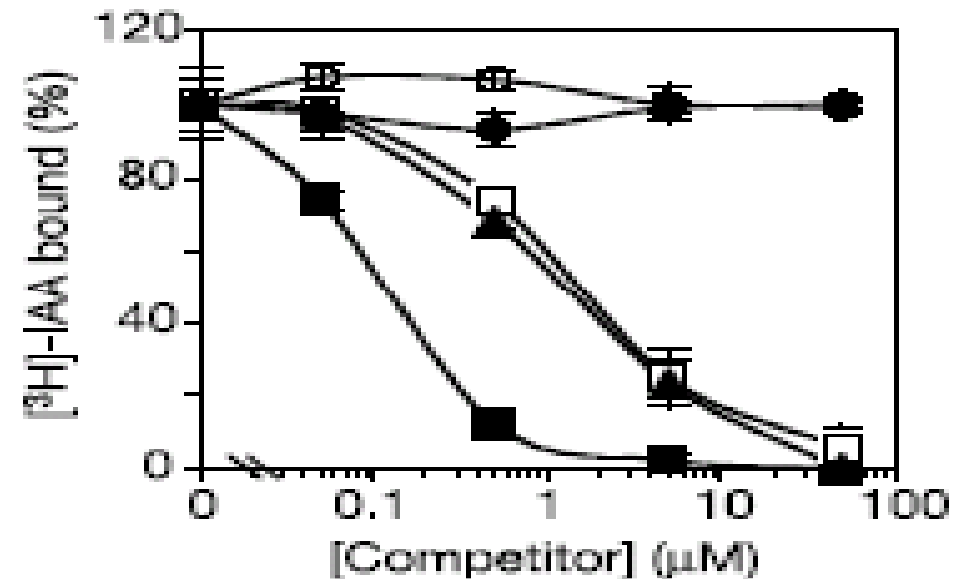
Hypothese : Auxin bindet direkt an den SCF^{TIR} Komplex

- Pull down assay mit GST-IAA7 und Rohextrakt in Gegenwart von [³H]-IAA
→ WT-Protein ist radioaktiv



- Kompetitive Bindeexperimente
→ aktive Auxine sind kompetitiv, inaktive Auxine nicht

→ **der Auxinrezeptor ist im SCF^{TIR1} Komplex**

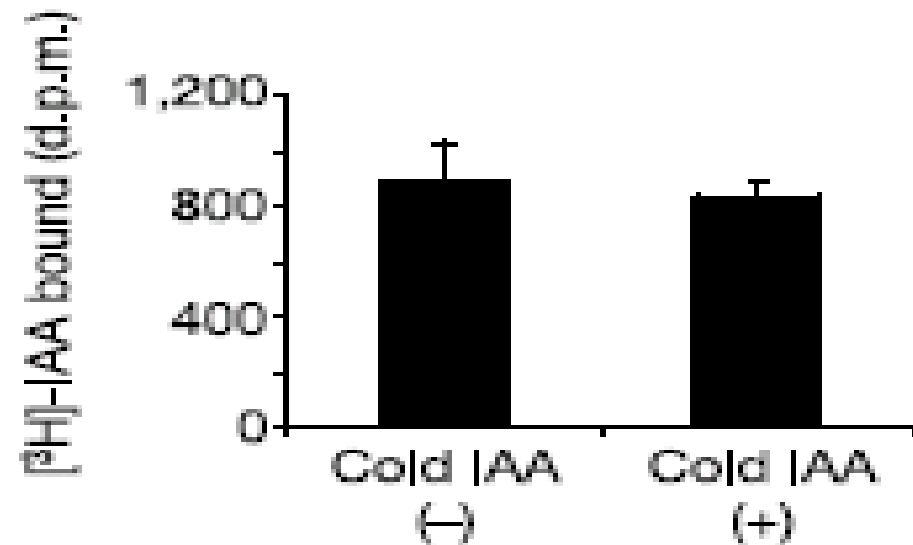


Frage : Interagiert GST-IAA7 allein mit [^3H]-IAA?

- GST-IAA7 mit [^3H]-IAA in Puffer inkubiert
- +/- kaltem IAA

Fazit : Bindung ist nicht - spezifisch

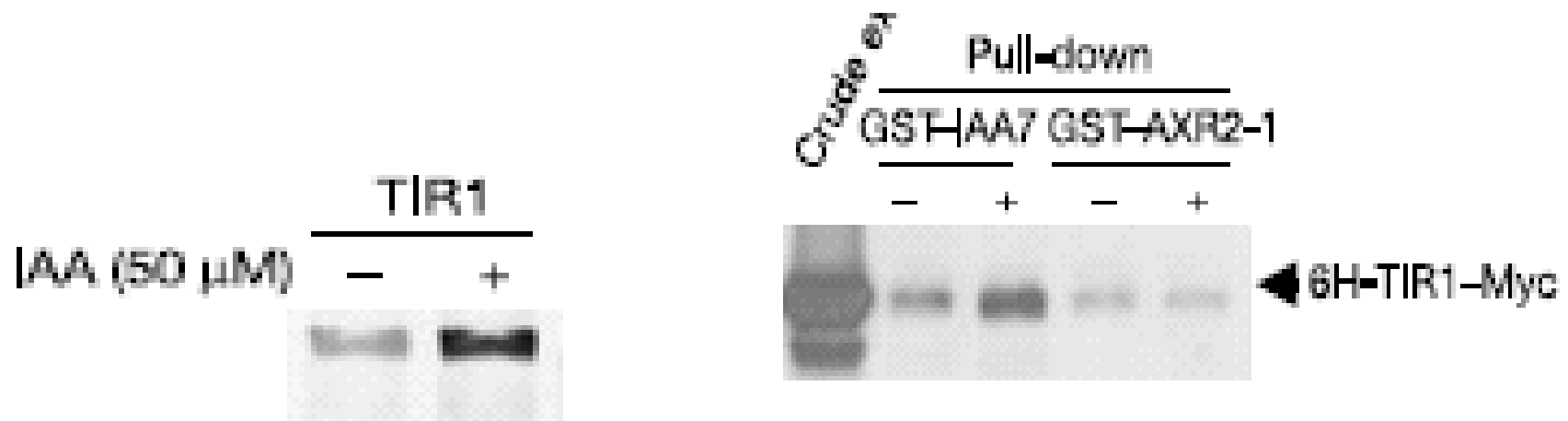
→ **Aux/IAA Proteine
sind keine
Auxinrezeptoren**



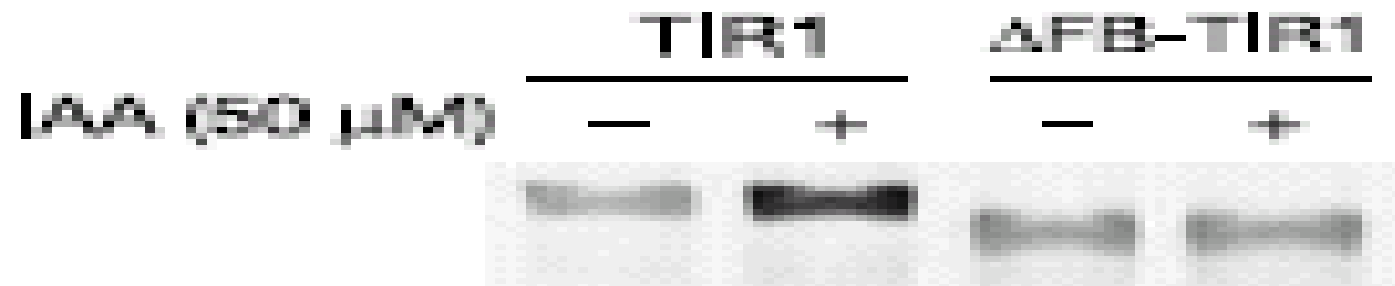
Hypothese : Auxin bindet direkt an TIR1 oder
an ein eng an TIR1 assoziiertes
Protein

- In vitro Translation von TIR1 in Weizenkeim Extrakt
- Frage : Beeinflußt endogenes Auxin im
Weizenkeimextrakt die Interaktion?

→ **Auxin bindet direkt an TIR1**



Immunoblot der Δ FB-TIR1 Mutante



- A) Deletierte Sequenz vermittelt direkt IAA und/oder Aux/IAA Bindung
- B) Deletierte Sequenz vermittelt Assemblierung von TIR1 an SCF
- C) Interaktion mit ASK1 ist nötig für TIR1 Funktion

Frage : Gibt es homologe Bereiche zwischen TIR1 und den AFB's

TIR1	-----MGRIRGTPDVLIVTFPGLDGRNLSLCKWYKERNCRGVETKCYVSDPMTIRNTPDNLVLKGRKFAADFLVPGGGGYG	95
AFB1	-----HGIRTPDVLIVTFPGLDGRNLSLCKWYKERNCRGVETKCYVSDPMTIRNTPDNLVLKGRKFAADFLVPGGGGYG	91
AFB2	-----LDTTPDVLIVTFPGLDGRNLSLCKWYKERNCRGVETKCYVSDPMTIRNTPDNLVLKGRKFAADFLVPGGGGYG	90
AFB3	-----LDTTPDVLIVTFPGLDGRNLSLCKWYKERNCRGVETKCYVSDPMTIRNTPDNLVLKGRKFAADFLVPGGGGYG	90
COI1	-----HEDMIRCKLCAATVDVETDPAITDGRDLSLCKWYKCRDSEKSRVIALCYTAPDLSRFPDNLVLKGRKFAADFLVPGGGGYG	102

Y1R1	WVHNSSTWVSRHNRKRVVVDGLRNRK	YHNVVLR	CGFSTGCLNATATSRHNRKLRSD	YHNSNLRH	YHNSLRVLRNRK	196
YFB1	WVHNSSTWVSRHNRKRVVVDGLRNRK	YHNVVLR	CGFSTGCLNATATSRHNRKLRSD	YHNSNLRH	YHNSLRVLRNRK	192
YFB2	WVHNSSTWVSRHNRKRVVVDGLRNRK	YHNVVLR	CGFSTGCLNATATSRHNRKLRSD	YHNSNLRH	YHNSLRVLRNRK	191
YFB3	WVHNSSTWVSRHNRKRVVVDGLRNRK	YHNVVLR	CGFSTGCLNATATSRHNRKLRSD	YHNSNLRH	YHNSLRVLRNRK	191
COH1	WVHNSSTWVSRHNRKRVVVDGLRNRK	YHNVVLR	CGFSTGCLNATATSRHNRKLRSD	YHNSNLRH	YHNSLRVLRNRK	204

TIR1	-PSSFGLLEKLTICHLKELKRAVYKLEKLTALQDANQDDEKTCSTPA--RQVDSGSHVINGREKCCSCGNDAPFADPAVTSVESHKLEK	296
AFB1	-QVSHLEGLKASHKELKLEKLTAVYDLSGYSLQANQLDGLKSHRAAL-KKASSTKQPSFNLQKQSSKMLLSTHLPALSVKQVQKLEK	292
AFB2	-QIVVLEKLEKSHKELKLEKRAVYKLEKLTALQDANQDDEKTCSTPA--RQVDSGSHVINGREKCCSCGNDAPFADPAVTSVESHKLEK	291
AFB3	-QIVVLEKLEKASHKELKLEKRAVYKLEKLTALQDANQDDEKTCSTPA--RQVDSGSHVINGREKCCSCGNDAPFADPAVTSVESHKLEK	291
COT1	AKSPKLEKLTARHRSLSLQEVG-DKFKLEKLTGFFKAQHLEKQCCGLKEDGMKRVKSLVPRLEK-----LQKVGQKQNDLQFQAKTRKLEK	300

TIK1	SVAT-PEPYPHALLERCSHQGLAVHDSISQGLAVANYCKELRLRVFQ	EPFVH-EP	VALTEGSLHVSQGLHRELVFQ	CGTMAALSTARK	395
AFH1	SVAT-PEPYPHALLERCSHQGLAVHDSISQGLAVANYCKELRLRVFQ	EPDLD-AT	IPTEGSLHVSQGLHRELVFQ	CGTMAALSTARK	391
AFB2	SVATPEGSHHALLERCSHQGLAVHDSISQGLAVASTCKELRLRVFQ	GLLH	GGTATFGLVHVSQGLHRELVFQ	CGTMAALSTARK	390
AFH3	SVATPEGSHHALLERCSHQGLAVHDSISQGLAVASTCKELRLRVFQ	SVETEN	ASVTHGLVHVSQGLHRELVFQ	CGTMAALSTARK	392
COI1	REAL-LETHDCLAKSGLVSLVSTVWDGSLGLVLAQSLRLHRCRQGLQ	GLHEDCLHVSQGLHRELVFQ	CGTMAALSTARK	401	

[illegible]

TF1R1	CTAALCHRAAGCTTMSLMMSSCS	CTGCAKLLGCHHPLNVEVIDRG----	AFDSKP	CSGFTVETVTVTVVQDSDTDR	CTVQDQSTMFPSRQILTY	591
TF1R1	CTAALCHRAAGCTTMSLMMSSCS	CTGCAKLLGCHHPLNVEVIDR-----	DFESKP	CSGFTVETVTVTVVQDSDTDR	CTVTHNHPNGYSHLAK-	595
TF1R2	CTAALNVEVCTTMSLMMSSCS	CTTSCGLKLLA--NAYLVNVEILNNDHNR	CTGLK	GRGVQDLALYTVTVVQDSDTDR	CTVTHL	575
TF1R3	CTAALNVEVCTTMSLMMSSCS	CTTSCGLKLLA--NAYLVNVEILNNDHNR	CTGLK	GRGVQDLALYTVTVVQDSDTDR	CTVTHL	577
CT1	CTATATATCTTSLALMGGVYASCT	CTGCAKLLGCHHPLNVEILNNDHNR	CTGLK	GRGVQDLALYTVTVVQDSDTDR	CTVTHL	592

Zusammenfassung

- Paper liefern Beweise, das TIR1 ein Auxinrezeptor ist, der :
 - die Degradation von Aux/IAA Proteinen vermittelt
 - einen Wechsel in der Genexpression von Auxin – induzierten Genen hervorruft
- Auxin bindet an TIR1 ► Konformationsänderung
oder
- Auxin bindet TIR1 und Aux/IAA
- Bindestelle von Auxin und TIR1 ist nicht bekannt
- auch extrazelluläre Auxinperzeption

Danke für Eure
Aufmerksamkeit